

51

Int. Cl.:

C 08 h, 1/00

C 07 d, 7/00

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

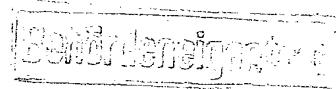
DEUTSCHES



PATENTAMT

52

Deutsche Kl.: 39 b6, 1/00



10

Offenlegungsschrift 2 364 792

11

Aktenzeichen: P 23 64 792.9

21

Anmeldetag: 27. Dezember 1973

22

Offenlegungstag: 18. Juli 1974

23

Ausstellungsriorität: —

30

Unionspriorität

32

Datum: 15. Januar 1973

33

Land: Südafrika

31

Aktenzeichen: 73-0275

54

Bezeichnung: Verfahren zum Reinigen von Gamma-Globulin

61

Zusatz zu: —

62

Ausscheidung aus: —

71

Anmelder: South African Inventions Development Corp., Pretoria,
Transvaal (Südafrika)

Vertreter gem. § 16 PatG: Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Weickmann, H., Dipl.-Ing.;
Fincke, K., Dipl.-Phys. Dr.; Weickmann, F.A., Dipl.-Ing.;
Huber, B., Dipl.-Chem.; Pat.-Anwälte, 8000 München

72

Als Erfinder benannt: Erfinder wird später benannt werden

DT 2 364 792

Patentanwälte
Dipl. Ing. F. Weickmann,
Dipl. Ing. H. Weickmann, Dipl. Phys. Dr. K. Fincke
Dipl. Ing. F. A. Weickmann, Dipl. Chem. B. Huber
8 München 27, Möhlstr. 22

2364792

SOUTH AFRICAN INVENTIONS DEVELOPMENT CORPORATION LIMITED
Scientia, Pretoria, 0002, Südafrika

Verfahren zum Reinigen von Gamma-Globulin

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines pyrogenfreien sehr reinen Gamma-Globulins, wobei ein Gamma-Globulin-Konzentrat und eine gerad- und langkettige, wasserlösliche, ungeladene Polymerverbindung mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 3000 und 20 000 bei zwischen 4°C und 30°C mit einer wässrigen Flüssigkeit innig vermischt werden, und nach erfolgter Phasentrennung eine unlösliche Fraktion abgetrennt, und aus der übrigbleibenden wässrigen Phase eine gereinigte Gamma-Globulin-Fraktion gewonnen wird.

Die Erfindung ist in erster Linie auf die Reinigung von menschlichem Gamma-Globulin anwendbar, lässt sich aber auf

die Reinigung von tierischem Gamma-Globulin anwenden. Die Erfindung ist insbesondere auf die Gewinnung eines gereinigten Gamma-Globulins aus Blutplasma anwendbar.

Gamma-Globulin wird im allgemeinen grosstechnisch aus Blutplasma durch fraktionierte Fällung mit Alkohol bei niederen Temperaturen, insbesondere gemäß dem sogenannten Cohn-Verfahren oder Abwandlungen dieses Verfahrens hergestellt.

Besonders bewährt hat sich das Verfahren von K. Kistler und Hs. Nitschmann (Vox.Sang 7; 414-424(1962)). Ein Verfahren zur Reinigung von Gamma-Globulin durch fraktionierte Fällung in neutraler wässriger Lösung mittels 8-10% Polyäthylenglykol ist bereits bekannt. Es wurde auch bereits vorgeschlagen, dem Cohn-Verfahren eine weitere Reinigungsstufe mittels, geradkettiger, langkettiger, wasserlöslicher, nicht-geladener Polymere, insbesondere Polyäthylenglykol nachzuschalten. (Paul W. Chun, Melvin Fried. und Elliot F. Ellis; Anal. Biochem. 12, 481-497(1967)). In diesem Verfahren wurden zunächst andere Proteine und schliesslich das Gamma-Globulin selbst mittels der Polymerverbindung gefällt und anschliessend durch umständliche Verfahren weiter gereinigt. Die Trennung und Reinigung sind unvollkommen.

Gemäß der nicht vorveröffentlichten OS P 22 34 069.8 wird ebenfalls mit Polymerverbindungen z.B. Polyäthylenglykol als Fällungsmittel bei pH 7.0 gearbeitet. Zunächst wird mit weniger Fällungsmittel (4,5-7%) antikomplementäre Aktivität (ACA) selektiv gefällt. Dabei treten noch Verluste an Gamma-Globulin ein, die aber teilweise aus dem gefällten Produkt rückgewonnen werden können. Aus der gereinigten Lösung wird das Gamma-Globulin dann mit 12-20% Polyäthylenglykol gefällt.

409829/0727

Es wurden mit diesem Verfahren beachtliche Erfolge, insbesondere hohe Reinheiten erzielt. Es hat sich aber gezeigt, dass für die grosstechnische Anwendung nach wie vor ein Bedarf besteht an einem Verfahren, das mit noch grösserer Genauigkeit und Wiederholbarkeit ein Produkt liefert das auch den allerhöchsten Anforderungen gerecht wird. Vor allem war es bisher noch nicht einwandfrei gelungen, gleichzeitig sowohl eine hohe Reinheit, als auch sehr hohe Ausbeuten zu erzielen.

Bevor ein grosstechnischer Gamma-Globulin-Ansatz therapeutisch verwendet wird, muss er zunächst unter anderem auf Pyrogengehalt geprüft werden. Hierzu wird eine Probe in ein Versuchstier eingespritzt. Falls das Tier Fieber entwickelt, sind Pyrogene vorhanden, und ist der gesamte Ansatz unbrauchbar. Pyrogenität tritt spontan, ohne ersichtlichen Grund ein. Die Ursache ist unbekannt, weshalb dieses Problem bisher nicht befriedigend gelöst werden konnte und woraus sich schwere Verluste an wertvollem Material ergaben.

Daraus ergibt sich die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zu schaffen, dass sich leicht in herkömmliche Blutfraktionierungsverfahren einschalten lässt, und womit mit grosser Sicherheit das Auftreten der Pyrogenität im Endprodukt vermieden werden kann, bzw. mittels dessen pyogene Gamma-Globulin-Fraktionen behandelt und pyrogenfrei gemacht werden können. Außerdem soll das Verfahren gut wiederholbar sein und einen besonders hohen Reinheitsgrad, (mindestens 99% rein und ausgezeichnete Ausbeuten) ermöglichen. Das Verfahren soll ferner eventuell vorhandene antikomplementäre Aktivität (ACA) beseitigen, wodurch das Endprodukt sich intravenös anwenden lässt. Ferner sollen durch das Verfahren auch

409829/0727

- 4 -

Spuren solcher Verunreinigungen beseitigt werden (insbesondere Enzyme), die die Lagerfähigkeit des Produktes benachteiligen.

Erfindungsgemäß ist das Verfahren der eingangserwähnten Art dadurch gekennzeichnet, dass in der wässrigen Flüssigkeit ein pH-Wert zwischen 4 und 5 eingestellt wird, dass die Polymerverbindung in einer solchen Konzentration in der wässrigen Flüssigkeit angewandt wird, dass die lösungshemmende Wirkung einer Konzentration von zwischen 4 und 4,8 Gramm pro 100 ml Polyäthylenglykol des Molekulargewichtes 6000 entspricht, und dass die Konzentration des Gamma-Globulins im Gemisch auf zwischen 3 und 8 Gewichtsprozent eingestellt wird.

Bei der innigen Vermischung wird die Proteinkonzentration (hauptsächlich Gamma-Globulin) vorzugsweise auf zwischen 3,5 und 6 Gewichtsprozent insbesondere zwischen 4 und 5 Gewichtsprozent eingestellt.

Der pH-Wert wird vorzugsweise mit Salzsäure eingestellt, und beträgt vorzugsweise zwischen 4,4 und 4,8, insbesondere zwischen 4,5 und 4,7. Hinsichtlich Reinheit und Ausbeute des Endproduktes wurden die besten Ergebnisse bei pH-Werten zwischen 4,55 und 4,65, insbesondere 4,60 erzielt. Selbst bei einer verhältnismässig geringen Verringerung des pH-Wertes

- 5 -

führte dies bereits zur Schädigung des Produktes. Aber auch eine ganz geringe Erhöhung beeinträchtigte bereits die Reinheit unter ansonsten gleichen Bedingungen. Diese Beobachtung widerspricht der bisherigen Ansicht, wonach vorzugsweise unter neutralen Bedingungen gearbeitet wurde. Chun, Fried und Ellis (siehe oben) hatten zwischen pH 4,9 und 8,6 keine Unterschiede festgestellt.

Das Verfahren erwies sich auch als überraschend empfindlich gegen selbst geringfügige Abweichungen in der Konzentration der als lösungshemmende Verbindung verwendeten Polymerverbindung. Besonders gute Ergebnisse wurden mit Konzentrationen erzielt, die in der lösungshemmenden Wirkung 4,3 bis 4,7 Gramm pro 100 ml. vorzugsweise zwischen 4,4 und 4,6, insbesondere 4,5 Gramm pro 100 ml Polyäthylenglykol des Molekulargewichtes 6000 entsprachen. Aus praktischen und wirtschaftlichen Erwägungen wird es tatsächlich bevorzugt, Polyäthylenglykol selbst als lösungshemmendes Mittel, insbesondere Polyäthylenglykol mit Molekulargewicht zwischen 4000 und 8000, vorzugsweise 6000 zu verwenden. Wie weiter unten erläutert wird, können jedoch auch andere Polymerverbindungen verwendet werden.

Die Ionenstärke der wässrigen Flüssigkeit beeinflusst ebenfalls den günstigen Verlauf des Verfahrens ganz erheblich, wobei die untere Grenze wesentlicher ist als die obere Grenze.

- 5 -

409829/0727

Die besten Ergebnisse wurden bei Ionenstärken zwischen 0,13 und 0,20M, vorzugsweise zwischen 0,14 und 0,17, insbesondere 0,15M erzielt, wobei die Ionenstärke vorzugsweise in erster Linie von NaCl herrührte. Auch diese Feststellung widerspricht den Beobachtungen von Chun, Fried und Ellis, die zwischen 0,1 und 2,0M Ionenstärke keine Unterschiede feststellten.

Das Verfahren lässt sich besonders vorteilhaft auf Gamma-Globulin-Fraktionen anwenden, die durch Fällung aus Plasma bei niederen Temperaturen mit Alkohol gewonnen wurden.

Besonders gute Ergebnisse werden erzielt, wenn die Fraktion in an sich bekannter Weise bei zwischen -8 und -4°, insbesondere -5°C und einem pH-Wert zwischen 5,6 und 6,0, insbesondere $5,85 \pm 0,05$ und einer Alkoholkonzentration zwischen 18 und 21%, insbesondere 19% gefällt wurde, wobei die Proteinkonzentration des Plasmas, aus welchem das Gamma-Globulin gefällt wurde, zwischen 4 und 5, insbesondere 4,5 Gewichtsprozent Protein betrug. Ein solcher Niederschlag enthält im allgemeinen noch α - und β -Globuline, und wird vorzugsweise vor der Anwendung der erfindungsgemässen Verfahrens einer weiteren Alkoholfällung zur Abtrennung dieser α - und β -Globuline unterworfen. Das nach dem obengenannten Verfahren von Kistler und Nitschmann gewonnene Gamma-Globulin eignet sich also besonders für das erfindungsgemässen Verfahren.

In praktischer Hinsicht erwies es sich als besonders vorteilhaft die Phasentrennung nach der Vermischung des

-7-

Gamma-Globulins mit der Polymerverbindung in der wässrigen Flüssigkeit so durchzuführen, dass man das Gemisch mindestens 4 bis 5 Stunden stehen lässt, wobei sich die unlösliche Fraktion in ausreichendem Masse absetzt, wonach die übr stehende Flüssigkeit, die das gereinigte Gamma-Globulin enthält, einfach durch Abheben oder Abpumpen entfernen lässt.

Die Bezeichnung "wasserlösliche, geradkettige, langkettige, ungeladene Polymerverbindung" bezeichnet eine Klasse lösungshemmender Mittel, die vor allen Dingen in der Proteinchemie Verwendung findet. Beispiele solcher Polymerverbindungen sind Dextran, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon und Nonylphenoläthoxylat.

Bevorzugte Polymerverbindungen für das Verfahren, sind die wasserlöslichen Polyalkylenglykole im Molekularbereich zwischen 3000 und 20 000, insbesondere 4000 und 8000, vorzugsweise etwa 6000. Vorzugsweise handelt es sich dabei um ein Polymerisat, bzw. Mischpolymerisat eines Glykols, bzw. von Glykolen, mit zwischen 2 und 4 Kohlenstoffatomen, z.B. Polyäthylenglykol oder Polypropylenglykol oder Polyäthylenpropylenglykol oder Poly-1,4-dihydroxybutanglykol bzw. um Gemische solcher Polyglykole. Polyäthylenglykol ist grosstechnisch leicht erhältlich und auch preislich günstig. Es hat auch günstige physikalische Eigenschaften, insbesondere im bevorzugten Molekulargewichtsbereich zwischen 4000 und 8000, vorzugsweise 6000.

-7-

409829/0727

Im allgemeinen kann die vom Hersteller angegebene Molekulargewichtsspanne des verwendeten Polymerproduktes zugrunde gelegt werden. Die handelsübliche Bezeichnung PEG 6000 deutet ein Produkt mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 6000 an. Nach Angaben der Hersteller (z.B. Shell Chemical Company) kann ein solches Produkt zwar den Bereich 6000-7500 umfassen. Diese Abweichungen sind jedoch von geringer praktischer Bedeutung für die Zwecke der vorliegenden Erfindung. Eigene Messungen zeigten, dass sich das verwendete Material fast ausschliesslich im sehr engen Molekulargewichtsbereich von zwischen 5800 und 6300 befand.

Im allgemeinen wird die lösungshemmende Polymerverbindung so verwendet, dass man die unerwünschten Verunreinigungen aus der wässrigen Lösung des Gamma-Globulins ausfällt. Prinzipiell ist jedoch auch die umgekehrte Arbeitsweise möglich, nämlich die selektive Extraktion eines Gamma-Globulin-haltigen Konzentrates mittels einer wässrigen Lösung der Polymerverbindung.

Die Polymerverbindungs-konzentration, die in ihrer lösungshemmenden Wirkung einer bestimmten Menge Polyäthylenglykol 6000 entspricht, lässt sich sehr leicht durch Vergleichsversuche feststellen, am besten anhand einer der wesentlichen Begleitsubstanzen in gereinigter Form, die man aus dem Gamma-Globulin-Konzentrat herausfällen möchte. Es lässt sich aber auch berechnen gemäss der Gleichung:

-9-

$$\beta = \frac{\left(1 + \frac{r_s}{r_r}\right)^3}{2.303}$$

worin β jeweils der zur Fällung benötigten Polymerverbindungs-konzentration umgekehrt proportional ist, und worin

r_r = Radius des Polymermoleküls und

r_s = Radius bzw. Stokes-radius des zu fällenden Teilchens ist.

Die Temperatur, bei welcher die Fällung mittels der Polymer-verbindung durchgeführt wird, ist nicht sehr kritisch. Am besten arbeitet man zwischen 15 und 25, insbesondere zwischen 20 und 25°C .

Im allgemeinen will man anschliessend aus dem Gamma-Globulin-Produkt die Polymerverbindung entfernen. Hierzu verdünnt man zu -nächst die Lösung vorzugsweise mit Wasser (dadurch wird bereits die Polymerkonzentration verringert), vorzugsweise mit gleichzeitiger Temperaturverringerung, wonach die Lösung annähernd neutralisiert wird, vorzugsweise auf ein pH von $7,0 \pm 0,5$, insbesondere $7,0 \pm 0,2$ gebracht wird. Die Lösung wird dann vorzugsweise zunächst auf zwischen 0 und 4°C abgekühlt, wonach man gegebenenfalls filtriert. Aus dieser Lösung wird das Gamma-Globulin bei niedriger Temperatur, insbesondere bei zwischen -4 und -8°C , vorzugsweise -6°C und unter nach wie vor annähernd neutralen pH-Bedingungen mit Alkohol gefällt, z.B. mit zwischen 20 und 28, vorzugsweise zwischen 20 und 25 Vo-lumenprozent Alkohol. Dabei beträgt die Temperatur vorzugsweise $-6^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

409829/0727

-10-

Das so erhaltene Produkt ist sehr rein und wird vorzugsweise in der gleichen Gewichtsmenge Eiswasser aufgeschwemmt und dann gefriergetrocknet. Das so erhaltende Gamma-Globulin-Pulver kann in an sich bekannter Weise, vorzugsweise in Gegenwart von Stabilisatoren, wieder in Lösung gebracht werden.

Man hat bisher angenommen, dass die Alkoholfällung unweigerlich die Bildung von ACA (antikomplementäre Aktivität) im Gamma-Globulin mit sich bringt. Überraschenderweise ist das nach dem soeben genannten Reinigungsverfahren mit Alkohol ausgefüllte Produkt ACA-frei. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ACA nur in Gegenwart bestimmter Verunreinigungen gebildet wird, und dass durch das erfindungsgemäße Verfahren bereits sämtliche Verunreinigungen, die in Gegenwart von Alkohol zur ACA-Bildung führen können, entfernt wurden.

Ausführungsbeispiel.

Das Ausgangsmaterial ist eine Plasmalösung mit 5% Gesamtproteingehalt, deren pH mit Puffer auf $7,2 \pm 0,2$ eingestellt ist. Diese Lösung wird mit 8 - 10 Volumenprozent Alkohol versetzt und zentrifugiert. Der Niederschlag (Fraktion 1) enthält Fibrinogen. Die überstehende Flüssigkeit enthält die Globuline und Albumin. Der pH-Wert dieser Lösung wird auf $5,85 \pm 0,05$ eingestellt. Die Lösung enthält 4,5% Protein. Sie wird auf -5°C abgekühlt, und bei dieser Temperatur mit 19% Alkohol versetzt und dann zentrifugiert. Die überstehende

-11-

Flüssigkeit kann auf Albumin aufgearbeitet werden. Das gefällte Produkt enthält sämtliche Gamma-Globuline und Teile der - und -Globuline.

Der Niederschlag wird nun in Pufferlösung suspendiert (etwa 2% Protein, pH $4,8 \pm 0,05$, 0°C). Dieses Material wird mit Alkohol weiter fraktioniert. Zunächst wird auf pH $5,1 \pm 0,05$ und -5°C eingestellt und dann mit 12% Alkohol versetzt ($\frac{1}{2}$ des Lösungsmittels 0,014, Proteininhalt etwa 1%). Durch Zentrifugieren werden die - und -Globuline ausgefällt.

Die überstehende Flüssigkeit wird auf pH $7,0 \pm 0,2$ gebracht und bei -7°C mit Alkohol versetzt, bis die Konzentration 25 Volumenprozent beträgt, ($\frac{1}{2}$ des Lösungsmittels 0,03 - 0,04, Proteininhalt etwa 0,5%). Der Niederschlag wird abzentrifugiert und bei -28°C als Gamma-Globulin-Paste aufbewahrt.

20 Kg der Gamma-Globulin-Paste werden in 80 Liter destilliertem Wasser bei 25°C mit Röhren gelöst (100 Liter Lösung). Als Puffer werden hinzugefügt: 0,005 M KH_2PO_4 , 0,005 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,14M NaCl. Die Proteinkonzentration beträgt 4 bis 5%. Nach völliger Lösung wird der pH-Wert mit 0,5M HCl auf genau 4,6 eingestellt. Die Lösung wird nun mit 4,5% Polyäthylenglykol Molekulargewicht 6000, versetzt. Das Gemisch wird eine Stunde lang gerührt, und danach lässt man den Ansatz vier weitere Stunden lang stehen. Dabei setzt sich ein

-42-

Niederschlag ab. Die überstehende Flüssigkeit wird nun von oben abgepumpt, bzw. abgehebert und durch einen handelsüblichen Filter filtriert, (X-D-5 der Firma Filtrix). Um zu vermeiden, dass der Filter verstopft wird, wird zunächst die oberste Flüssigkeit abgezogen und das Ansaugerohr allmählich mit der Flüssigkeitsoberfläche weiter gesenkt.

Das Filtrat wird mit 2 Volumen destillierten Wassers bei 4°C verdünnt. Nach Abkühlen auf $0 - 4^{\circ}\text{C}$ wird der pH-Wert auf $7,0 \pm 0,2$ eingestellt und wieder filtriert (AKS-4 kohlebeschichtetes Filter). Das Gamma-Globulin-Filtrat wird nun mit 25 Volumenprozent Alkohol versetzt bei -6°C (pH $7,0 \pm 0,2$). Der durch Zentrifugieren gewonnene Niederschlag des Gamma-Globulins wird in der gleichen Gewichtsmenge Eiswasser suspendiert und dann gefriertrocknet.

Eine 16 prozentige Lösung dieses sehr reinen Gamma-Globulin-Pulvers mit 0,3 M Glycinpuffer und 0,01% Merthiolat, sterilfiltriert, entspricht in seinen physikalischen, chemischen und biologischen Daten den Vorschriften des M.I.H. der Vereinigten Staaten von Amerika.

Das Gamma-Globulin ist mindestens 99% rein, ist pyrogenfrei, ACA-frei und enzymfrei. Die Haltbarkeit ist deshalb aussergewöhnlich hoch. Die obengenannte 16 prozentige Lösung enthält höchstens 0,01% Polyäthylenglykol. Für intravenöse

- 13 -

Anwendungen wird das Material auf 4 bis 5% Proteingehalt verdünnt, und ohne Merthiolat verwendet. Als Stabilisatoren können der Lösung Albumin, Glukose und/oder Glycin beigegeben werden.

Vorzugsweise wird die Lösung folgendermassen vorbereitet:

Intravenöse Gamma-Globulin-Lösung.

Die benötigte Menge Gamma-Globulin-Pulver wird zunächst mit soviel Glycin versetzt, dass die Endkonzentration der Lösung 0,06 M betragen wird. Zu diesem Gemisch fügt man die halbe Menge des benötigten pyrogenfreien destillierten Wassers bei 4°C hinzu. Durch leichtes Rühren bringt man das Gamma-Globulin in Lösung. Zur Lösung wird soviel pasteurisierte 20prozentige Albuminlösung hinzugefügt, dass die Albuminkonzentration in der endgültigen Lösung 1,0% beträgt.

Diese Lösung lässt man bei 4°C über Nacht mit leichtem Rühren stehen. Am nächsten Morgen wird so viel Glukose hinzugefügt, dass die Glukosekonzentration in der endgültigen Lösung 3,0% beträgt. Der pH-Wert wird auf etwa 6,9 eingestellt, und darauf wird das Endvolumen eingestellt. Die Lösung wird steril in Flaschen filtriert. Das Endprodukt hat dann die folgende Zusammensetzung:

- 14 -

4 - 5 (vorzugsweise 4,5) Gewichtsprozent Gamma-Globulin, 3,0% Glukose, 0,06 M Glycin, 1,0% Albumin. Die Lösung ist isotonisch.

Im Gegensatz zu den gewürdigten bekannten bzw. bereits vorgeschlagenen Verfahren wird im erfindungsgemässen Verfahren in einem kritischen leicht säuerlichen pH-Bereich gearbeitet. Wenn alle Faktoren optimal eingestellt sind, bringt eine einige Fällungsstufe mit verhältnismässig wenig Polymethylenglykol oder dergleichen eine völlige Fällung sämtlicher Verunreinigungen zustande, und sind trotzdem die Verluste an Gamma-Globulin im Niederschlag so gering, dass eine Rückgewinnung überflüssig ist. Das Verfahren erfordert nur minimalen apparativen Aufwand und lässt sich sehr leicht und billig in bestehende Verfahren und Anlagen eingliedern.

- 14 -

409829/0727

1. Verfahren zur Herstellung eines pyrogenfreien, sehr reinen Gamma-Globulins, wobei ein Gamma-Globulin-Konzentrat und eine geradkettige, langkettige, wasserlösliche, ungeladene Polymerverbindung, beispielsweise mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 3000 und 20 000 bei zwischen 4°C und 30°C mit einer wässrigen Flüssigkeit innig vermischt werden und nach erfolgter Phasentrennung eine unlösliche Fraktion abgetrennt, und aus der übrigbleibenden wässrigen Phase eine gereinigte Gamma-Globulin-Fraktion gewonnen wird, dadurch gekennzeichnet, dass in der wässrigen Flüssigkeit ein pH-Wert zwischen 4 und 5 eingestellt wird, dass die Polymerverbindung in einer solchen Konzentration in der wässrigen Flüssigkeit angewandt wird, dass die lösungshemmende Wirkung einer Konzentration von zwischen 4 und 4,8 Gramm pro 100 ml Polyäthylenglykol des Molekulargewichtes 6000 entspricht, und dass die Konzentration des Gamma-Globulins im Gemisch auf zwischen 3 und 8 Gewichtsprozent eingestellt wird.
2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert auf zwischen 4,4 und 4,8, vorzugsweise zwischen 4,5 und 4,7 eingestellt wird.
3. Verfahren gemäss Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert auf zwischen 4,55 und 4,65 eingestellt wird.

- 16 -

4. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der wässrigen Flüssigkeit mit Salzsäure eingestellt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass bei der innigen Vermischung, der Proteingehalt (hauptsächlich Gamma-Globulin) im wässrigen Gemisch auf zwischen 3,5 und 6 Gewichtsprozent, vorzugsweise zwischen 4 und 5 Gewichtsprozent eingestellt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerverbindung in einer Konzentration angewandt wird, deren lösungshemmende Wirkung zwischen 4,3 und 4,7, vorzugsweise zwischen 4,4 und 4,6 Gramm pro 100 ml Polyäthylenglykol des Molekulargewichts 6000 entspricht.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Polymerverbindung Polyäthylenglykol mit Molekulargewicht zwischen 4000 und 8000 in einer Konzentration verwendet wird, deren lösungshemmende Wirkung zwischen 4,3 und 4,7 Gramm pro 100 ml Polyäthylenglykol des Molekulargewichtes 6000 entspricht, wobei vorzugsweise Polyäthylenglykol des Molekulargewichtes 6000 selbst vorzugsweise in einer Konzentration zwischen 4,4 und 4,6 Gramm pro 100 ml des Gemisches zur Anwendung kommt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch

gekennzeichnet, dass die Ionenstärke der wässrigen Flüssigkeit auf zwischen 0,13 und 0,20 M, vorzugsweise mit Kochsalz eingestellt wird.

9. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass als Ausgangsmaterial eine Gamma-Globulin-Fraktion verwendet wird, die in an sich bekannter Weise durch Alkoholfällung bei niederer Temperatur gewonnen wurde.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Phasentrennung vor der Abtrennung der mittels der Polymerverbindung unlöslich gemachten Fraktion, durchgeführt wird, indem man das wässrige Gemisch mindestens 4 - 5 Stunden lang stehen lässt, wonach die überstehende Flüssigkeit, in welcher das gereinigte Gamma-Globulin gelöst ist, abgezogen, vorzugsweise von oben her abgehebert bzw. abgepumpt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass zur Befreiung des Produktes von Polymerverbindung, die Lösung zunächst mit Wasser verdünnt wird (wodurch die Polymerkonzentration verringert wird), vorzugsweise mit gleichzeitiger Temperatursenkung, wonach die Lösung neutralisiert wird, vorzugsweise auf einen pH-Wert von $7,0 \pm 0,5$, vorzugsweise $7,0 \pm 0,2$, wonach das Gamma-Globulin in an sich bekannter Weise mit Alkohol gefällt wird.

- 18 -

12. Verfahren gemäss Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das mit Alkohol gefällte Gamma-Globulin in etwas Eiswasser aufgeschwemmt und dann gefriergetrocknet wird.

13. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das gereinigte Gamma-Globulin in Wasser gelöst und mit Albumin und Glycin stabilisiert wird.